

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT04/000713

International filing date: 21 December 2004 (21.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT  
Number: RM2003A000590  
Filing date: 22 December 2003 (22.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# *Ministero delle Attività Produttive*

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*

*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

*Ufficio G2*

---



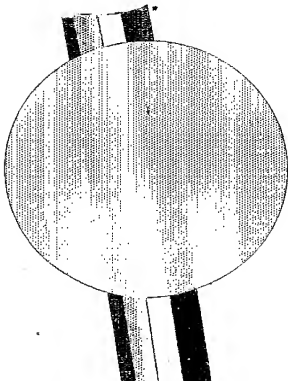
**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000590.**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

10 FEB. 2005

ROMA li.....

IL FUNZIONARIO  
*Elena Marinelli*  
Sig.ra E. MARINELLI



# MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

RM 2003 A 000590

## A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 00273530527
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Banchi di Sotto 55 - 53100 Siena - IT		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
<b>B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO</b>		B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)	
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	B3			
<b>C. TITOLO</b>		C1	FORMULAZIONE A BASE DI POLIMETAFOSFATI PER LA CURA DI ARTROPATIE MICROCRISTALLINE	

## D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	CATENACCIO MANUELA
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	CHINDAMO DANIELA
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	LORENZINI SAURO
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	MARCOLONGO ROBERTO
NAZIONALITA'	D2	

<b>E. CLASSE PROPOSTA</b>	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1		E2		E3	
				E4	
				E5	

## F. PRIORITA'

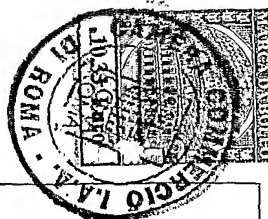
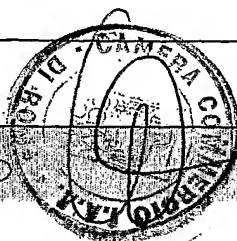
DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I

*dyccapasso*



# MODULO A (2/2)

## I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME:	I1	820B CAPASSO OLGA; 473BM FIORUZZI MARIA AUGUSTA
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	DE SIMONE & PARTNERS S.P.A.
INDIRIZZO	I3	VIA VINCENZO BELLINI 20
CAP/ LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	00198 ROMA
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	SI ALLEGA DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DELLA LETTERA DI INCARICO

## M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. Es. ALL.	N. Es. Ris.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	1		42
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)			
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	NO
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

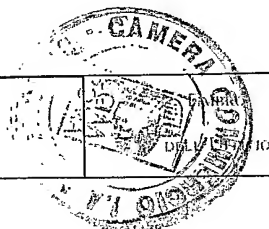
### IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO	Euro	DUECENTONOVANTUNO/80
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	A	D X F
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	SI	
	NO	
DATA DI COMPILAZIONE	21/12/2003	

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

### VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	RM 2003 A 000590	
C.C.I.A.A. DI	ROMA	Cod. 58
IN DATA	22/12/2003	, IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	01	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE		
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE	



L'ufficiale Rogante  
Giuseppe Fattori

## FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

RM 2003 A 000590

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

FOGLIO AGGIUNTIVO N.

1

DI TOTALI:

1

## A. RICHIEDENTE/I

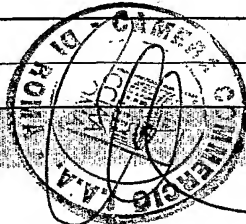
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3	
INDIRIZZO COMPLETO	A4			

## D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	SELVI ENRICO
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	CINI RENZO
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	TAMASI GABRIELLA
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	GREGORKIEWITZ MICHELE
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	CAMPANA ALBERTO
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	CAVALLO GIOVANNI
NAZIONALITÀ	D2	

## F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I					

**PROSPETTO MODULO A**  
**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

NUMERO DI DOMANDA: **PM 2003 A 000590** DATA DI DEPOSITO: **22 DIC. 2003**

**A. RICHIEDENTE/I** COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;  
'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA  
SIENA (IT)

**C. TITOLO**

Formulazioni a base di polimetafosfati per la cura di artropatie microcristalline



SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

**E. CLASSE PROPOSTA**

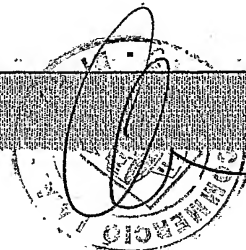
**O. RIASSUNTO**

Composizione farmaceutica solubile per il trattamento di patologie articolari comprendente una quantità efficace di almeno un polimetafosfato lineare o ciclico o un suo sale solubile e farmaceuticamente accettabile, e eventualmente opportuni diluenti.

**P. DISEGNO PRINCIPALE**

FIRMA DEL / DEI  
RICHIEDENTE / I

*Alga Capasso*



## DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo:  
"Formulazioni a base di polimetafosfati per la cura di artropatie microcristalline"

a nome: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA

inventori: Catenaccio Manuela, Chindamo Daniela, Lorenzini Sauro,  
Marcolongo Roberto, Selvi Enrico, Cini Renzo, Tamasi Gabriella,  
Gregorkiewitz Michele, Campana Alberto, Cavallo Giovanni

\*\*\*\*\*

La presente invenzione concerne composizioni a base di polimetafosfati per la cura di artropatie microcristalline.

### *Stato dell'arte*

Le artropatie da microcristalli sono un gruppo di patologie infiammatorie-degenerative, caratterizzate dalla deposizione di sostanze minerali in strutture articolari e periarticolari in forma cristallina. In particolare la condrocalcinosi è una malattia caratterizzata da depositi microcristallini di pirofosfato di calcio diidrato,  $\text{Ca}_2[\text{O}(\text{PO}_3)_2](2\text{H}_2\text{O})$  (CPPD). In corso di condrocalcinosi si verificano frequentemente episodi sinovitici secondari alla liberazione di cristalli di CPPD dai depositi tissutali nell'ambiente sinoviale. L'identificazione dei cristalli nel liquido sinoviale di pazienti con artrite simil gottosa è stata descritta nel 1962 da McCarty [McCarthy DJ Jr, Kohn NN, Faires JS. The significance of calcium phosphate crystal in the synovial fluid of arthritis patients: the pseudogout syndrome. *Clinical aspects. Ann Intern Med* 56: 711-737 (1962)].

Un'altra comune artropatia microcristallina è causata dal deposito di cristalli di idrossiapatite,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (HAP), a livello articolare e periarticolare. Solitamente questa patologia si manifesta in associazione con altre artropatie a preminente carattere degenerativo quali osteoartrosi, periartrite calcifica, tendinite e borsiti calcifiche. Seppure i depositi calcifici spesso non siano associati a manifestazioni cliniche specifiche, possono assumere particolare rilevanza in condizioni quali le periartriti calcifiche della spalla, nelle quali si ritiene che tali calcificazioni siano in parte responsabili delle manifestazioni degenerative infiammatorie delle strutture periarticolari [Dieppe PA, Crocker P, Huskisson EC, Willoughby DA. Apatite deposition disease: a new arthropathy. *Lancet* 1: 266-268 (1976)].

Il meccanismo che porta alla precipitazione e deposizione dei cristalli di CPPD o HAP non è ancora conosciuto, né appare chiaro se le alterazioni degenerative della cartilagine siano primitive o secondarie alla deposizione dei cristalli. L'ipotesi più probabile è che tale deposizione sia dovuta ad una locale alterazione metabolica. Nel caso della condrocalcinosi, il pirofosfato prodotto dai condrociti si diffonderebbe nella sostanza fondamentale in rapporto ad un'aumentata sintesi o ad una incapacità tessutale di idrolizzare il composto con enzimi pirofosfatasi, compresa la fosfatasi alcalina. Piccoli depositi di pirofosfato si osservano spesso nella cartilagine di soggetti anziani, soprattutto in seguito a un'aumentata sintesi e concentrazione di pirofosfati, ad opera di enzimi nucleoside trifosfato pirofosfoidrolasi (NTPPPH) [Ryan ML, McCarthy DJ. Calcium Pyrophosphate Crystal Deposition Disease; Pseudogout; Articular Chondrocalcinosis. In:



*Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology* (D.J. McCarthy & W.J. Koopman eds.), vol. 2 (12<sup>th</sup> ed.), Philadelphia, Pa, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1835-1855 (1993)]. I pirofosfati a loro volta sono un'importante fonte di fosfati inorganici, che hanno un ruolo fondamentale nella mineralizzazione delle ossa. Esiste un equilibrio tra pirofosfati e fosfati: quando i primi prevalgono, si ha la loro precipitazione sotto forma cristallina; quando prevalgono i fosfati si ha una maggiore solubilizzazione e riduzione dei cristalli di pirofosfato [Anderson HC. Mechanisms of pathologic calcification. *Rheum Dis Clin N Am* **14**: 303-319 (1988); Rosen F, McCabe G, Quach J, Solan J, Terkeltaub R, Seegmiller JE, Lotz M. Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor  $\alpha$  increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation. *Arthritis Rheum* **40**: 1275-1281 (1997)].

I cristalli di CPPD hanno una forma romboidale allungata sebbene vengano a volte evidenziati a forma di bastoncini lunghi o corti e piccoli quadrati, mentre i cristalli di HAP sono più piccoli e di forma aghiforme o a bastoncino. Attualmente si ritiene che l'attacco acuto di pseudogotta sia dovuto alla liberazione nella cavità articolare (liquido sinoviale) di cristalli di CPPD, i quali vengono rivestiti (opsonizzati) di proteine (specialmente IgG) e quindi riconosciuti e fagocitati dai polimorfonucleati neutrofili (PMN). Durante la fagocitosi e la successiva distruzione cellulare si liberano enzimi lisosomiali, specie reattive dell'ossigeno (ROS), leucotrieni, che agiscono come mediatori chimici dell'infiammazione, con conseguente artrite acuta o pseudogotta [Burt HM, Jackson JK. Enhancement of crystal induced neutrophil responses

by opsonisation of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *Ann Rheum Dis* **52**: 599-607 (1993)]. Si suppone che anche la forma, le dimensioni e la quantità di cristalli giochino ruoli ben specifici nell'attivazione dei PMN. In proposito esistono numerosi studi che, benché confermino l'attività proflogogena dei cristalli di CPPD, poco si accordano soprattutto sulle dimensioni del materiale cristallino in grado di stimolare più intensamente i fagociti [Shwan A et al, Schumacher HR, Fishbein P, Phelps R, Krauser R. Comparison of sodium urate and calcium pyrophosphate crystal size and other factors. *Arthritis Rheum* **18** (suppl): 783-793 (1995)].

Al momento sono disponibili soltanto terapie sintomatiche per ridurre l'attacco acuto di pseudogotta, spesso insufficienti ad avere un effetto duraturo nel tempo.

Il trattamento più utilizzato per la forma acuta consiste nell'effettuare un'artrocentesi sull'articolazione infiammata associata eventualmente al lavaggio articolare con soluzione fisiologica e/o infiltrazione locale di corticosteroidi [Fitzgerald RH Jr. Intrasyovial injection of steroids uses and abuses. *Mayo Clin Proc* **51**: 655-659 (1976); Werlen D, Gabay C, Vischer TL. Corticosteroid therapy for the treatment of acute attacks of crystal-induced arthritis: an effective alternative to nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Rev Rhum Engl Ed* **63**: 248-254 (1996)].

In alternativa o in associazione alla terapia suddetta, si utilizzano gli antiinfiammatori non steroidei e/o colchicina anche se permane in ogni caso il problema della persistenza dei cristalli di CPPD o HAP a livello tissutale [Abramson SB. Treatment of gout and crystal arthropathies



and use and mechanisms of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol* 4: 295-300 (1992)].

Attualmente l'unica profilassi per l'attacco pseudogottoso, è costituito dall'utilizzo della colchicina per via orale [Gonzales T, Gantes M. Prevention of acute attacks of pseudogout with oral colchicine. *J Rheumatol* 14: 632-633 (1987); Lange U, Schumann C, Schmidt KL. Current aspects of colchicine therapy – classical indications and new therapeutic uses. *Eur J Med Res* 6: 150-160 (2001)]. Nel caso dei cristalli di CPPD sono stati tentati degli approcci utilizzando la via enzimatica, ossia gli enzimi che sono in grado di degradare i pirofosfati, come la pirofosfatasi di lievito e la fosfatasi alcalina, anche se questi tentativi non hanno trovato un valido sbocco terapeutico, presumibilmente, per la difficoltà di preparare adeguate formulazioni di origine proteica per problemi di tipo antigenico e per gli alti costi di produzione [Xu Y, Cruz T, Cheng PT, Pritzker KP. Effects of pyrophosphatase on dissolution of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J Rheumatol* 18: 66-71 (1991); Shinozaki T, Xu Y, Cruz TF, Pritzker KP. Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystal dissolution by alkaline phosphatase: interaction of alkaline phosphatase on CPPD crystals. *J Rheumatol* 22: 117-123 (1995)].

Risultati incoraggianti, seppur non risolutivi, sembra dare l'uso orale di carbonato di magnesio, con lo scopo di solubilizzare e inibire la formazione di cristalli di CPPD [Patel KJ, Weidepsnul D, Palma C, Ryan LM, Walker SE. Milwaukee shoulder with massive bilateral cysts: effective therapy for hydrops of the shoulder. *J Rheumatol* 24: 2479-2483 (1997)].

In letteratura sono inoltre presenti descrizioni aneddotiche della parziale efficacia del glicosaminoglicano polisolfato nella riduzione dei depositi cartilaginei di CPPD [Sarkozi AM, Nemeth-Csoka M, Bartosiewicz G. Effects of glycosaminoglycan polysulphate in the treatment of chondrocalcinosis. *Clin Exp Rheumatol* 6: 3-8 (1988)].

Come precedentemente accennato, non è ben chiara l'azione patogenetica dei cristalli di HAP nello sviluppo di manifestazioni infiammatorie articolari, sebbene gli aggregati cristallini di HAP siano frequentemente presenti nei versamenti articolari sia di natura infiammatoria che degenerativa, facendo ritenere la loro presenza un epifenomeno. Al contrario è ben nota l'azione di tali sostanze nello sviluppo di patologie degenerative infiammatorie periarticolari, quali le periartriti calcifiche, espresse clinicamente nei quadri di spalle dolorose acute e/o croniche. Attualmente infatti vi sono trattamenti finalizzati alla distruzione e/o rimozione di tali depositi microcristallini quali i lavaggi articolari con soluzione fisiologica e le onde d'urto extracorporee (ESWT) [Cosentino R, De Stefano R, Selvi E, Frati E, Manca S, Frediani B, Marcolongo R. Extracorporeal shock wave therapy for chronic calcific tendinitis of the shoulder: single blind study. *Ann Rheum Dis* 62: 248-50 (2003); Ebenbichler GR, Erdogmus CB, Resch KL, Funovics MA, Kainberger F, Barisani G, Aringer M, Nicolakis P, Wiesinger GF, Baghestanian M, Preisinger E, Fialka-Moser V. Ultrasound therapy for calcific tendinitis of the shoulder. *N Engl J Med* 341: 1237 (1999)].

Per quanto riguarda la dissoluzione dei cristalli di HAP, esistono pochissimi dati in letteratura, tra l'altro utilizzando sostanze chimiche

che non hanno alcuna prospettiva di utilizzo terapeutico [Dorozhkin SV. Surface reactions of apatite dissolution. *J Colloid Interface Sci* **191**: 489-497 (1997)].

La mancanza di trattamenti terapeutici mirati alla dissoluzione dei depositi tissutali di CPPD ed HAP, ha indotto gli autori alla ricerca di principi chimici capaci di sciogliere i cristalli presenti nell'ambiente articolare e periarticolare.

Da lungo tempo è nota l'attività dei polimetafosfati, antagonista alla cristallizzazione di sali a base di calcio (es. carbonato di calcio e il solfato di calcio) ed altri metalli (es. ferro, magnesio). Questa classe di composti trova pertanto largo impiego come agenti addolcitori di acque dure e industriali, detergenti in industrie tessili e/o agenti disperdenti in operazioni di colorazione di tessuti. In cosmetica, i polimetafosfati risultano particolarmente efficaci nel trattamento di depositi calcarei quali il tartaro, e sono infatti importanti ingredienti di dentifrici antiplacca [Draus F.M. et al. Pyrophosphate and hexametaphosphate effects in vitro calculus formation. *Archs. Oral Biol.* **15**: 893-896 (1970); McClanahan S.F., White D.J., Cox E.R. Dentifrice compositions containing polyphosphate and monofluorophosphate. Brevetto US 6,190,644 (2001)].

È stata dimostrata la capacità di tali sostanze di ridurre le calcificazioni aortiche nel ratto [Fleish H, Schiller D, Maerki J, Frossard I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphate. *Nature* **207**: 1300-1301 (1965)] e le calcificazioni della pelle, sempre nel ratto [Schibler D, Fleisch H. Inhibition of skin calcification (calciophylaxis) by polyphosphates. *Experientia* **22**: 367-369 (1966)] e, di conseguenza,

è ipotizzabile un utilizzo terapeutico finalizzato alla solubilizzazione di calcificazioni ectopiche [Irving JT, Schibler D, Fleisch H. Bone formation in normal and vitamin D-treated rachitic rats during the administration of polyphosphates. *Proc Soc Exp Biol Med* **123**: 332-335 (1966)].

Gli autori hanno già descritto la capacità solubilizzante in vitro di alcuni polimetafosfati su aggregati di CPPD [Cini R, Chindamo D, Catenaccio M, Lorenzini S, Selvi E, Nerucci F, Picchi MP, Berti G, Marcolongo R.

Dissolution of calcium pyrophosphate crystals by polyphosphates: an *in vitro* and *ex vivo* study. *Ann Rheum Dis* **60**: 962-967 (2001)]. Tuttavia il possibile limite all'utilizzo clinico di tali sostanze deriva dal fatto che:

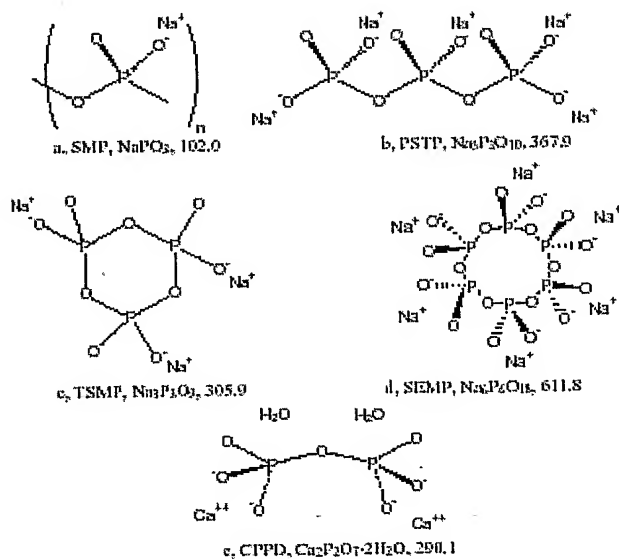
- 1) gli stessi polimetafosfati non sono univocamente identificati con un definito peso molecolare, avendo la formula  $(\text{NaPO}_3)_n$ , con n che può variare da 3 a oltre 20;
- 2) i cristalli dissolti parzialmente e ridotti di volume (ed eventualmente opsonizzati) in seguito a un'aumentata solubilità del pirofosfato, potrebbero essere fagocitati dai PMN e macrofagi con aumento della noxa infiammatoria, ulteriore produzione di ROS e inizio di un circolo vizioso che potrebbe ulteriormente aggravare il quadro patologico, con persistenza della flogosi [Oyanagui Y. Role of phosphate, pyrophosphate, adenine nucleotides and sulphate in activating production of the superoxide radical by macrophages, and in formation of rat paw edema. *Agents Actions* **7**: 125-132 (1977); Swan A, Heywood B, Chapman B, Seward H, Dieppe P. Evidence for a causal relationship between the structure, size, and load of calcium pyrophosphate dihydrate crystals, and attacks of pseudogout. *Ann Rheum Dis* **54**: 825-830 (1995); Biaglow JE, Kachur AV. The generation of hydroxyl radicals in the



reaction of molecular oxygen with polyphosphate complexes of ferrous ion. *Radiat Res* **148**: 181-187 (1997)].

Nella presente invenzione i problemi sopra indicati vengono risolti grazie alla messa a punto di formulazioni che contengono polimetafosfati di struttura definita o loro sali, eventualmente associati a una o più sostanze con azione antiradicalica e/o a agenti antiossidanti.

Forma pertanto oggetto dell'invenzione una composizione farmaceutica solubile comprendente una quantità efficace di almeno un polimetafosfato lineare o ciclico o un suo sale solubile e farmaceuticamente accettabile, e eventualmente opportuni diluenti. Preferibilmente il sale del polimetafosfato è un sale sodico ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>n</sub>; più preferibilmente è compreso nel seguente gruppo: metafosfato polimerico (SMP, formula a); tripolimetafosfato (PSTP, formula b); trimetafosfato ciclico (TSMP, formula c), esametafosfato ciclico (SEMP, formula d).



In una forma preferita di attuazione la composizione comprende ulteriormente quantità efficaci di antiossidanti e/o scavenger delle ROS, come ad esempio mannitolo, vitamina E, vitamina C, carotenoidi, tocoferolo, taurina, glucosamina solfato, glucosamina cloridrato. Sono da escludere N-acetilcisteina, glutatione. Fra questi, per la loro efficacia, tollerabilità e semplicità di preparazione sono da preferire il mannitolo, la taurina e/o la glucosamina o suoi sali.

Il mannitolo è un potente "scavenger" dei radicali ossidrilici [Chaturvedi V, Wong B, Newman SL. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J Immunol* **156**: 3836-3840 (1996)]. La taurina è un potente "scavenger" dell'anione ipoclorito, dei radicali nitrossidi e di tutte le ROS prodotti da PMN e/o macrofagi attivati [Park E, Alberti J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol* **442**: 177-182 (1998)]. Il polimetafosfato non solo riesce a solubilizzare i cristalli a base di calcio (pirofosfati di Ca, idrossiapatite) responsabili di alcune artropatie, ma risulta essere un agente antiossidante che agisce sinergicamente con noti antiossidanti, con conseguente riduzione di fenomeni infiammatori.

In una forma preferita la formulazione dell'invenzione è associata anche a una o più sostanze "scavenger".

Le soluzioni ottenute possono essere iniettate direttamente nelle articolazioni, o essere usate per lavaggio in continuo delle stesse articolazioni, con concentrazioni variabili sia dei polimetafosfati che



degli agenti antiossidanti, al fine di privilegiare la solubilizzazione dei microcristalli responsabili della calcificazione dell'articolazione, o la riduzione della "noxa" infiammatoria. Tali soluzioni devono essere isotoniche, in considerazione del loro utilizzo intrarticolare (isotonia compresa tra 270-328 mOsmol/litro), Inoltre tuttavia è ipotizzabile anche l'utilizzo di soluzione ipo/ipertoniche da utilizzarsi nelle varie fasi terapeutiche.

La formulazione dell'invenzione permette di inibire la presenza di ROS a livello delle strutture articolari prodotte dalla fagocitosi effettuata dai PMN e/o macrofagi a livello delle strutture cristalline. Tale meccanismo è responsabile dello stress ossidativo, che è un componente importante del processo infiammatorio, quest'ultimo alla base degli attacchi di pseudogotta.

Le formulazioni, in particolare quelle contenenti esametafosfato di sodio, da solo o in associazione con antiradicali e/o antiossidanti, sono state testate *in vitro* per valutare la capacità di solubilizzare cristalli sintetici di CPPD (sia monoclina che triclina). Le prove di solubilizzazione dei suddetti cristalli sono state effettuate anche *ex vivo* su menischi calcificati prelevati attraverso la meniscectomia per via artroscopica da pazienti affetti da condrocalcinosi. Inoltre sono state effettuate prove di citotossicità delle soluzioni utilizzate su colture di condrociti umani.

Le stesse formulazioni sono state testate *in vitro* per valutarne la capacità solubilizzante pure sui cristalli di HAP.

Ciascuna formulazione, in particolare quelle contenenti anche gli antiradicali e antiossidanti, è stata incubata *in vitro* con PMN e/o macrofagi per determinare con il metodo della chemiluminescenza la

capacità di bloccare la produzione di radicali liberi prodotti da PMN opportunamente stimolati. Inoltre è stato valutato anche l'effetto scavenger sull'anione superossido, il principale radicale libero responsabile di fenomeni infiammatori.

E' anche oggetto dell'invenzione una formulazione farmaceutica iniettabile per via intraarticolare comprendente un primo contenitore, contenente la composizione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3 in polvere, e un secondo contenitore contenente una soluzione di diluente in cui è disciolta almeno una sostanza ad azione antiradicalica e/o una sostanza ad azione anti-ossidante; la composizione del primo contenitore viene disciolta prima dell'uso. Il volume della formulazione varia da 5 a 10 ml. La soluzione di diluente può essere usata in associazione o non ai polimetafosfati, al fine di sfruttarne le capacità antiradicaliche ed antiossidanti.

La formulazione dell'invenzione può essere anche utilizzata per lavaggio in continuo di un'articolazione. In questo caso il volume della formulazione varia da 5 a 50 ml.

Rientra nell'ambito dell'invenzione una formulazione farmaceutica di contenimento da utilizzarsi dopo la solubilizzazione di cristalli di CPPD o HAP in un'articolazione comprendente un contenitore contenente una soluzione di diluente iniettabile per via intraarticolare, leggermente ipotonica, in cui è disciolta almeno una sostanza ad azione antiradicalica e/o antiossidante. Le formulazioni di contenimento hanno un volume variabile tra 5 e 50 ml.

L'invenzione verrà ora descritta in suoi esempi non limitativi in riferimento anche alla Figura 1 che illustra le formule e relativi pesi



molecolari dei composti usati come agenti dissolventi (a-d) e del CPPD (e).

#### Esempio 1 PREPARAZIONE DI SOLUZIONI SOLUBILIZZANTI IN TAMPONE PBS

Sono state preparate soluzioni contenenti polimetafosfati, sia lineari che ciclici e misurati pH ed osmolalità come si evince dalla seguente tabella

1.A.

Tabella 1.A – Preparazione di soluzioni solubilizzanti con polimetafosfati in PBS

Soluzione	Polimetafosfato testato	Preparazione	Parametri controllati
A	Sodio metafosfato polimerico (SMP)	500 mg di SMP sono stati pesati e aggiunti accuratamente a 100 ml di tampone PBS	pH = 6.9 Isotonia = 284 mOsm
B	Sodio tripolifosfato lineare (PSTP)	500 mg di SMP sono stati pesati e aggiunti accuratamente a 100 ml di tampone PBS	pH = 8.7 Isotonia = 300 mOsm
C	Sodio trimetafosfato ciclico (TSMP)	500 mg di SMP sono stati pesati e aggiunti accuratamente a 100 ml di tampone PBS	pH = 7.3 Isotonia = 314 mOsm
D	Sodio esametafosfato ciclico (SEMP)	500 mg di SMP sono stati pesati e aggiunti accuratamente a 100 ml di tampone PBS	pH = 7.0 Isotonia = 285 mOsm

#### Esempio 2 MISURAZIONE ATTIVITA' SOLUBILIZZANTE SUI CRISTALLI CPPD

##### Descrizione della procedura di solubilizzazione e metodo di analisi

5 mg di cristalli sintetici di CPPD, sia triclini che monoclini (con dimensioni medie di 1-30  $\mu\text{m}$ ) sono stati aggiunti a 5 ml di tampone fosfato senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS) contenente differenti tipi di polimetafosfato alla concentrazione di 5 mg/ml (le quattro soluzioni citate nella Tabella 1.A).

La sospensione è stata mantenuta a 37°C per 1 ora sotto continua agitazione e successivamente filtrata attraverso filtri da 0,22  $\mu$ m. I filtrati sono stati sottoposti ad analisi con spettrofotometria in assorbimento atomico per misurazioni della concentrazione finale di calcio ed in base a questo dato è stata calcolata la percentuale di dissoluzione dei cristalli di CPPD.

#### Risultati di solubilizzazione e conclusioni

I risultati ottenuti possono essere riassunti nella seguente tabella 2.A.

Tabella 2.A – Effetto solubilizzante sui cristalli di CPPD dopo 1 ora di incubazione a 37°C in PBS

Soluzione	Polimetafosfato (5 mg/ml)	Dissoluzione (espressa in mg di CPPD/ml)	% di dissoluzione
a	Sodio metafosfato polimerico (SMP)	0.344 (12)	27.5
b	Sodio tripolifosfato lineare (PSTP)	0.310 (11)	24.7
c	Sodio trimetafosfato ciclico (TSMP)	0.023 (5)	1.9
d	Sodio esametafosfato ciclico (SEMP)	0.461 (12)	55,4

I risultati mostrano che la potenza solubilizzante dei polimetafosfati presi in esame sui microcristalli di CPPD può essere espressa nel seguente ordine: SEMP > SMP > PSTP > TSMP.

Il sodio esametafosfato esplica la massima attività solubilizzante del pirofosfato di calcio, mentre il sodio trimetafosfato ciclico non ha in pratica alcuna capacità solubilizzante.

La capacità solubilizzante del sodio esametafosfato (SEMP) è stata poi

misurata anche in funzione del tempo, osservando la percentuale di dissoluzione di CPPD a 15, 30 e 60 minuti a 37°C. I risultati sono riportati nella tabella 2.B.

Tabella 2.B – Andamento della capacità dissolvente di SEMP (5mg/ml) verso i cristalli di CPPD a tempi crescenti

Tempo Minuti (37°C)	Dissoluzione (espressa in mg di CPPD/ml)	% di dissoluzione
15	0.423	50.8
30	0.451	54.0
60	0.461	55.4

L'effetto del sodio esametafosfato quindi appare essere rapido, con una rilevante dissoluzione già a 15 minuti. Tali risultati indicano un possibile utilizzo di questa soluzione per via intrarticolare per la solubilizzazione dei CPPD. (punto numero 4 dei risultati raggiunti)

### Esempio 3 EFFETTO SOLUBILIZZANTE SUI CRISTALLI HAP

#### Descrizione della procedura di solubilizzazione e metodo di analisi

Con metodica simile all'esempio precedente (usando 8 mg di cristalli di HAP), sono state studiate le capacità dissolventi delle formulazioni descritte nella Tabella 1.A anche sui microcristalli sintetici di HAP (10-20  $\mu$ m).

#### Risultati di solubilizzazione e conclusioni

I risultati ottenuti possono essere riassunti nella seguente tabella 3.A

Tabella 3.A – Effetto solubilizzante sui cristalli di HAP dopo 1 ora di incubazione a 37°C in PBS

Soluzione	Polimetafosfato (5 mg/ml)	Dissoluzione (espressa in mg di CPPD/ml)	% di dissoluzione
a	Sodio metafosfato polimerico (SMP)	0.288 (11)	18.0
d	Sodio esametafosfato ciclico (SEMP)	0.150 (9)	10.0



I risultati mostrano che la capacità dissolvente sui cristalli di HAP è maggiore per SMP che per SEMP. Anche in questo caso i valori sono relativamente alti e tali da programmare procedure di lavaggio in continuo di articolazioni contenenti calcificazioni di HAP.

La capacità solubilizzante del sodio metafosfato polimerico (SMP) è stata poi misurata in funzione del tempo (come nell'esempio precedente) e i risultati sono riassunti nella tabella 3.B.

Tabella 3.B – Andamento della capacità dissolvente di SMP (5mg/ml) verso i cristalli di HAP a tempi crescenti

Tempo Minuti (37°C)	Dissoluzione (espressa in mg di HAP/ml)	% di dissoluzione
15	0.273 (11)	17.0
30	0.296 (12)	18.5
60	0.288 (11)	18.0

Questo risultato dimostra che una rilevante dissoluzione viene raggiunta anche in tempi brevi (15 minuti) se paragonata alla dissoluzione massima raggiunta a tempi maggiori.

#### Esempio 4 CONTROLLO EFFETTO CITOTOSSICO SUI CONDROCITI

##### Descrizione del test di citotossicità

Campioni di cartilagine articolare sono stati ottenuti dalle teste femorali di pazienti affetti da osteoartrite e sottoposti a protesizzazione dell'anca.

Subito dopo l'asportazione, porzioni di cartilagine sana sono state rimosse asetticamente e frammenti di 2 mm<sup>3</sup> sono stati lavati in fisiologica con antibiotici e quindi digeriti con 1 mg/ml di collagenasi clostridiale in PBS con antibiotici per 14-18 ore a 37°C con moderata agitazione. La soluzione è stata poi filtrata, lavata in fisiologica e centrifugata. Circa 90-95% dei condrociti sono risultati vitali col metodo del colorante vitale Trypan blue e quindi prelavati e lasciati in piastre con adatto terreno in coltura a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>.

Le cellule così ottenute sono state incubate con crescenti concentrazioni di polimetafosfati in PBS (pH 7,4) per 24 ore (6 pozzetti per ciascuna concentrazione testata). La coltura di controllo è stata ottenuta incubando cellule con solo PBS per 24 ore.

La citotossicità è stata determinata dopo 1 giorno di esposizione sia con sodio metafosfato polimerico (SMP) che con sodio esametafosfato ciclico (SEMP) con il metodo del sale tetrazolio (MTT). In parallelo, condrociti umani incubati per 24 ore sia con SMP che con SEMP sono stati prelevati dai pozzetti, lavati in PBS, centrifugati e fissati per 2 ore a 4°C in fissativo Karnovsky, lavati in tampone cacodilato e post-fissati per un'ora a 4°C con 1% di ossido di osmio tamponato, disidratati e infine inclusi in resina per essere sottoposti a sezioni con ultramicrotomo. Circa 30 condrociti per ciascun paziente sono stati esaminati al microscopio elettronico.

#### Risultati dell'effetto citotossico e conclusioni

I risultati sono riassunti nella seguente tabella 4.A.

Tabella 4.A – Effetto citotossico di concentrazioni crescenti di polimetafosfati (SMP o SEMP) su condrociti umani col metodo MTT

	Soluzioni SMP (mg/ml)				
	0	1	2	5	15
% di cellule metabolicamente attive (media $\pm$ DS)	100	95,0 $\pm$ 3,2	92,8 $\pm$ 4,0	63,2 $\pm$ 5,1	50,0 $\pm$ 7,6
	Soluzione SEMP (mg/ml)				
	0	1	2	5	15
% di cellule metabolicamente attive (media $\pm$ DS)	100	86,7 $\pm$ 4,6	85,2 $\pm$ 6,8	68,0 $\pm$ 5,2	48,3 $\pm$ 8,4

I valori sono espressi come medie  $\pm$  DS di 4 esperimenti separati.

I risultati dimostrano che la dose inibitoria 50% veniva raggiunta alla massima concentrazione testata (15 mg/ml). La valutazione morfologica al microscopio elettronico non ha mostrato in nessun caso alterazioni a carico delle strutture cellulari.

#### Esempio 5 FORMULAZIONI A BASE DI SEM E SEMP, ASSOCIATI A COMPONENTI CON ATTIVITA' ANTIRADICALICA E/O ANTIOSSIDANTE

##### Formulazioni farmaceutiche di SEMP con anti-ROS

Sono state preparate diverse formulazioni farmaceutiche composte da sodio esametafosfato ciclico con diversi composti che hanno capacità "scavenger" delle ROS e dell'anione ipoclorito.

Di ciascuna formulazione prescelta è stata controllata la loro capacità solubilizzante dei cristalli CPPD, per verificare se la presenza di sostanze antiossidanti e/o antiradicaliche potesse inibire la solubilizzazione dei sali di pirofosfato.

Le formulazioni farmaceutiche sono riportate di seguito:



<b>Formulazione A</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio esametafosfato ciclico	1,5
Potassio fosfato monobasico	0,04
Potassio cloruro	0,04
Sodio fosfato dibasico	0,23
Sodio cloruro	0,65
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>297</b>
<b>PH</b>	<b>7,5</b>
<b>Aspetto</b>	<b>limpido</b>

<b>Formulazione B</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio esametafosfato ciclico	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato dibasico	0,345
Mannitolo	3,17
Taurina	0,3
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>292</b>
<b>PH</b>	<b>7,5</b>
<b>Aspetto</b>	<b>limpido</b>

<b>Formulazione D</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio esametafosfato ciclico	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Glucosamina solfato	2,20
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>310</b>
<b>PH</b>	<b>6,7</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione O</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio esametafosfato ciclico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,12
Potassio cloruro	0,12
Sodio fosfato di basico	0,69
Mannitolo	1,55

Taurina	0,3
Isotonia mOsm	290
PH	7,3
Aspetto	Limpido



Formulazione F Componenti	Concentrazione % (p/v)
Sodio esametafosfato ciclico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Mannitolo	3,17
Glucosamina solfato	0,4
Isotonia mOsm	304
PH	7,0
Aspetto	Limpido

Formulazione L Componenti	Concentrazione % (p/v)
Sodio esametafosfato ciclico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,1
Potassio cloruro	0,1
Sodio fosfato di basico	0,575
Mannitolo	2,64
N-acetilcisteina	0,32
Isotonia mOsm	302
PH	6,6
Aspetto	Limpido

Formulazione N Componenti	Concentrazione % (p/v)
Sodio esametafosfato ciclico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,12
Potassio cloruro	0,12
Sodio fosfato di basico	0,69
Mannitolo	1,55
Taurina	0,3
N-acetilcisteina	0,32

<b>Isotonia mOsm</b>	<b>297</b>
<b>PH</b>	<b>6,6</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

Formulazioni farmaceutiche di SMP con anti-ROS

<b>Formulazione A1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	1,5
Potassio fosfato monobasico	0,04
Potassio cloruro	0,04
Sodio fosfato di basico	0,23
Sodio cloruro	0,65
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>295</b>
<b>PH</b>	<b>7,4</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione B1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato dibasico	0,345
Mannitolo	3,17
Taurina	0,3
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>290</b>
<b>PH</b>	<b>7,4</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione D1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Glucosamina solfato	2,20

<b>Isotonia mOsm</b>	<b>308</b>
<b>PH</b>	<b>6,6</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione O1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,12
Potassio cloruro	0,12
Sodio fosfato di basico	0,69
Mannitolo	1,55
Taurina	0,3
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>287</b>
<b>PH</b>	<b>7,2</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione F1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Mannitolo	3,17
Glucosamina solfato	0,4
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>300</b>
<b>PH</b>	<b>6,9</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione L1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,1
Potassio cloruro	0,1
Sodio fosfato di basico	0,575
Mannitolo	2,64
N-acetilcisteina	0,32
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>299</b>
<b>PH</b>	<b>6,5</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione N1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,12
Potassio cloruro	0,12
Sodio fosfato di basico	0,69
Mannitolo	1,55
Taurina	0,3
N-acetilcisteina	0,32
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>295</b>
<b>PH</b>	<b>6,5</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

#### Controllo capacità solubilizzante sui cristalli CPPD

Le succitate formulazioni O, F, L, N, contenenti SEMP con diversi composti ad attività antiradicalica e/o antiossidante, sono state valutate per la loro capacità solubilizzante sui cristalli CPPD.

Le formulazioni farmaceutiche O e F, contenenti SEMP rispettivamente con mannitolo + taurina e con mannitolo + glucosamina solfato, sono risultate attive nella solubilizzazione dei cristalli di CPPD come dimostrano i risultati riportati nella seguente tabella 5.A.

Tabella 5.A – Effetto solubilizzante sui cristalli CPPD (Formulazioni O e

F)

<b>Tempo di incubazione (in minuti a 37 °C)</b>	<b>Dissoluzione (espressa in mg di CPPD/ml)</b>	<b>% di dissoluzione</b>
15	0.527	53.1
30	0.552	57.2
60	0.577	62.4

Le formulazioni farmaceutiche L e N, contenenti SEMP rispettivamente con mannitolo + taurina + N-acetilcisteina e con mannitolo + N-acetilcisteina, sono risultate inattive nella solubilizzazione dei cristalli di CPPD, infatti il mezzo dissolvente perde pressoché totalmente la sua

potenzialità nei confronti dei cristalli di CPPD e la concentrazione di calcio nel filtrato risulta al di sotto del limite di rilevabilità della tecnica utilizzata.

Le succitate formulazioni O1, F1, L1, N1, contenenti SMP con diversi composti ad attività antiradicalica e/o antiossidante, sono state valutate per la loro capacità solubilizzante sui cristalli CPPD.

Le formulazioni farmaceutiche O1 e F1, contenenti SMP rispettivamente con mannitolo + taurina e con mannitolo + glucosamina solfato, sono risultate attive nella solubilizzazione dei cristalli di CPPD come dimostrano i risultati riportati nella seguente tabella 5.B

Tabella 5.B – Effetto solubilizzante sui cristalli CPPD (Formulazioni O1 e F1)

Tempo di incubazione (in minuti a 37 °C)	Dissoluzione (espressa in mg di CPPD/ml)	% di dissoluzione
15	0,189	20,5
30	0,214	23,2
60	0,254	27,5

I risultati sopra riportati sono sorprendenti in quanto dimostrano che la scelta degli antiossidanti e degli antiradicalici deve essere mirata. Ad esempio la presenza di un potente antiossidante, come la N-acetilcisteina, può ridurre drasticamente l'effetto solubilizzante dei polifosfati.

#### Controllo capacità solubilizzante sui cristalli HAP

Le succitate formulazioni O, F, L, N, contenenti SEMP con diversi composti ad attività antiradicalica e/o antiossidante, sono state valutate per la loro capacità solubilizzante sui cristalli HA.



Le formulazioni farmaceutiche O e F, contenenti SEMP rispettivamente con mannitolo + taurina e con mannitolo + glucosamina fosfato, sono risultate attive nella solubilizzazione dei cristalli di HA come dimostrano i risultati riportati nella seguente tabella 5.C.

Tabella 5.C – Effetto solubilizzante sui cristalli HAP (Formulazioni O e F)

Tempo di incubazione (in minuti a 37 °C)	Dissoluzione (espressa in mg di HAP/ml)	% di dissoluzione
15	0.128	8.4
30	0.134	8.9
60	0.150	10.0

Le formulazioni farmaceutiche L ed N, contenenti SEMP rispettivamente con mannitolo + taurina + N-acetilcisteina e con mannitolo + N-acetilcisterna, sono risultate inattive nella solubilizzazione dei cristalli di HAP, infatti il mezzo dissolvente perde pressoché totalmente la sua potenzialità nei confronti dei cristalli di HAP e la concentrazione di calcio nel filtrato risulta al di sotto del limite di rilevabilità della tecnica utilizzata.

Le succitate formulazioni O1, F1, L1, N1, contenenti SMP con diversi composti ad attività antiradicalica e/o antiossidante, sono state valutate per la loro capacità solubilizzante sui cristalli HA.

Le formulazioni farmaceutiche O1 e F1, contenenti SMP rispettivamente con mannitolo + taurina e con mannitolo + glucosamina fosfato, sono risultate attive nella solubilizzazione dei cristalli di HA come dimostrano i risultati riportati nella seguente tabella 5.D.

Tabella 5.D – Effetto solubilizzante sui cristalli HAP (Formulazioni O1 e

F1)

Tempo di incubazione (in minuti a 37 °C)	Dissoluzione (espressa in mg di HAP/ml)	% di dissoluzione
15	0,121	8,1
30	0,127	8,5
60	0,136	9,1

Anche nel caso della solubilizzazione di cristalli HA, la scelta degli antiossidanti e degli antiradicalici deve essere mirata perché la presenza di un potente antiossidante come la N-acetilcisteina in pratica annulla l'effetto solubilizzante dei polifosfati.

#### Esempio 6 MISURAZIONE ATTIVITÀ ANTIRADICALICA E/O ANTIOSSIDANTE

##### Formulazioni farmaceutiche testate di SEMP con anti-ROS

Formulazione A componenti	Concentrazione % (p/v)
Esametafosfato di sodio	1,5
Potassio fosfato monobasico	0,04
Potassio cloruro	0,04
Sodio fosfato dibasico	0,23
Sodio cloruro	0,65
Isotonia mOsm	297
pH	7,5
aspetto	Limpido

Formulazione B componenti	Concentrazione % (p/v)
Esametafosfato di sodio	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato dibasico	0,345
Mannitolo	3,17
Taurina	0,3



<b>Isotonia mOsm</b>	<b>292</b>
<b>pH</b>	<b>7,5</b>
<b>aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione C componenti</b>	<b>Concentrazione % (p/v)</b>
Potassio fosfato monobasico	0,02
Potassio cloruro	0,02
Sodio fosfato dibasico	0,115
Mannitolo	5,17
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>306</b>
<b>pH</b>	<b>7,5</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione D componenti</b>	<b>Concentrazione % (p/v)</b>
Esametafosfato di sodio	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Glucosamina solfato	2,20
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>310</b>
<b>pH</b>	<b>6,7</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione E componenti</b>	<b>Concentrazione % (p/v)</b>
Potassio fosfato monobasico	0,08
Potassio cloruro	0,08
Sodio fosfato dibasico	0,46
Glucosamina solfato	2,20
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>312</b>
<b>Ph</b>	<b>6,9</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione F componenti</b>	<b>Concentrazione % (p/v)</b>
Esametafosfato di sodio	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345

Mannitolo	3,17
Glucosamina solfato	0,4
Isotonia mOsm	304
pH	7,0
Aspetto	Limpido



Formulazione G componenti	Concentrazione % (p/v)
Potassio fosfato monobasico	0,08
Potassio cloruro	0,08
Sodio fosfato di basico	0,46
Mannitolo	3,17
Glucosamina solfato	0,4
Isotonia mOsm	302
pH	7,2
Aspetto	Limpido

Formulazione O componenti	Concentrazione % (p/v)
Sodio esametafosfato ciclico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,12
Potassio cloruro	0,12
Sodio fosfato di basico	0,69
Mannitolo	1,55
Taurina	0,3
Isotonia mOsm	290
pH	7,3
Aspetto	Limpido

Formulazioni farmaceutiche testate di SMP con anti-ROS

Formulazione A1 Componenti	Concentrazione % (p/v)
metafosfato di sodio	1,5
Potassio fosfato monobasico	0,04
Potassio cloruro	0,04
Sodio fosfato dibasico	0,23
Sodio cloruro	0,65

<b>Isotonia mOsm</b>	<b>295</b>
<b>PH</b>	<b>7,4</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione B1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
metafosfato di sodio	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato dibasico	0,345
Mannitolo	3,17
Taurina	0,3
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>290</b>
<b>PH</b>	<b>7,4</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione C1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Potassio fosfato monobasico	0,02
Potassio cloruro	0,02
Sodio fosfato dibasico	0,115
Mannitolo	5,17
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>304</b>
<b>PH</b>	<b>7,4</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione D1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
metafosfato di sodio	0,75
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Glucosamina solfato	2,20
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>308</b>
<b>pH</b>	<b>6,6</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione E1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Potassio fosfato monobasico	0,08
Potassio cloruro	0,08

Sodio fosfato dibasico	0,46
Glucosamina solfato	2,20
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>310</b>
<b>Ph</b>	<b>6,8</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione F1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
metafosfato di sodio	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,06
Potassio cloruro	0,06
Sodio fosfato di basico	0,345
Mannitolo	3,17
Glucosamina solfato	0,4
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>302</b>
<b>PH</b>	<b>6.9</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione G1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Potassio fosfato monobasico	0,08
Potassio cloruro	0,08
Sodio fosfato di basico	0,46
Mannitolo	3,17
Glucosamina solfato	0,4
<b>Isotonia mOsm</b>	<b>300</b>
<b>PH</b>	<b>7,1</b>
<b>Aspetto</b>	<b>Limpido</b>

<b>Formulazione O1</b>	<b>Concentrazione %</b>
<b>Componenti</b>	<b>(p/v)</b>
Sodio metafosfato polimerico	0,5
Potassio fosfato monobasico	0,12
Potassio cloruro	0,12
Sodio fosfato di basico	0,69
Mannitolo	1,55
Taurina	0,3

Isotonia mOsm	287
PH	7,2
Aspetto	Limpido

#### Procedura per il test di chemiluminescenza prodotta da PMN umani

La chemiluminescenza [De Luca MA, McElroy WD. Bioluminescence and chemiluminescence. *Methods in Enzymol* **133**: 449-493 (1986)] è un metodo per valutare l'azione scavenger sul pool dei ROS prodotti da polimorfonucleati (PMN) stimolati con zymosan [10 mg/ml di tampone fosfato senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS); Sigma] opsonizzato secondo il metodo English [English D, Roloff JS, Lukens JN. Regulation of human polymorphonuclear leucocyte superoxide release by cellular response to chemotactic peptides. *J Immun* **126**: 165-171 (1981)]. I PMN sono stati ottenuti da prelievi di sangue venoso periferico di soggetti sani mediante centrifugazione in gradiente di densità :polymorphoprep (Nycomed), che, una volta centrifugato, forma un gradiente di densità sul quale si separano le cellule del sangue.

La purezza (>90%) e la vitalità (>95%) della popolazione cellulare sono state verificate mediante l'esame di uno striscio e l'esecuzione del test di esclusione del trypan blue. In seguito ad un'aliquota (100  $\mu\text{l}$ ) di una sospensione contenente  $10^6$  PMN  $\text{ml}^{-1}$  di PBS, sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di luminolo (2 mg in 10 ml di NaOH 0.01M diluito successivamente 1:10 con con PBS) e 10  $\mu\text{l}$  di stimolatore. Il preparato è stato introdotto nel chemiluminometro (Berthold Multi-biolumat LB 9505C) a 37°C; la cinetica della reazione è stata letta per 40 minuti.

Tutti i valori di cpm riportati sulle tabelle sono estrapolati da una media di 2 valori (analisi in doppio).

Per ogni esperimento sono state effettuate tre distinte prove.

Test di inibizione della chemiluminescenza prodotta da PMN umani relativo a soluzioni contenenti SEMP in presenza o meno di altre sostanze antiossidanti

I risultati sono raccolti nella seguente tabella 6.A

Tabella 6.A – Effetto sulla chemiluminescenza di formulazioni contenenti SEMP e antiossidanti



Formulazione	Prova 1	Prova 2	Prova 3
	% inibizione	% inibizione	% inibizione
Basale			
A	79,4	77,3	80,2
B	77,9	75,5	77,1
C	7,0	7,7	8,3
D	94,5	92,9	94,4
E	86,9	82,1	86,9
F	96,9	87,7	91,2
G	66,3	64,5	74,1
O	56,5	65,7	66,6

N.B le formulazioni C (taurina e mannitolo), G (glucosamina e mannitolo) e E (glucosamina) non contengono SEMP.

I risultati dell'inibizione della chemiluminescenza dovuta a quantità scalari di esametafosfato di sodio, senza antiossidanti, sono invece riportati nella seguente tabella 6.B.

Tabella 6.B – Effetto sulla chemiluminescenza di quantità scalari di sodio SEMP (da solo)

Concentrazione di SEMP in PBS (mg/ml)	Prova 1	Prova 2	Prova 3
	% inibizione	% inibizione	% inibizione
Basale	---	---	---
0,5	32,4	17,5	33,4
1	64,8	50,0	66,9
2	74,6	72,5	70,0
4	81,0	80,0	74,3
7,5	97,8	84,0	76,9

Tutte le formulazioni testate hanno mostrato un potente effetto inibitorio della chemiluminescenza prodotta dai PMN umani con la procedura già descritta. Il risultato più eclatante ed inaspettato è stato che semplici soluzioni di esametafosfato di sodio in PBS hanno mostrato un potente effetto inibente la chemiluminescenza. L'aggiunta di noti antiossidanti e/o antiradicalici ha permesso di mantenere l'effetto inibitorio della chemiluminescenza.

Inoltre le formulazioni C, E, G che non contengono SEMP devono essere considerate le formulazioni di contenimento o meglio di lavaggio dell'articolazione dopo che si è intervenuti con le soluzioni contenenti esametatosfato di sodio. Queste soluzioni devono essere considerate come uno strumento per il trattamento della condrocalcinosi e quindi per la profilassi degli episodi pseudogottosi.

Test di inibizione della chemiluminescenza prodotta da PMN umani relativo a soluzioni contenenti SMP in presenza o meno di altre sostanze antiossidanti

Tabella 6.C – Effetto sulla chemiluminescenza di formulazioni contenenti SMP e antiossidanti

Formulazione	Prova 1	Prova 2	Prova 3
	% inibizione	% inibizione	% inibizione
Basale	---	---	---
A1	75,9	72,5	75,0
B1	92,5	90	91,5
D1	84,9	80,1	83,9
F1	54,3	62,5	72,5
O1	77,4	75,0	78,5

I risultati dell'inibizione della chemiluminescenza dovuta a quantità scalari di sodio metafosfato polimerico, senza antiossidanti, sono invece riportati nella seguente tabella 6.D

Tabella 6.D – Effetto sulla chemiluminescenza di quantità scalari di SMP (da solo)

Concentrazione di SMP in PBS (mg/ml)	Prova 1	Prova 2	Prova 3
	% inibizione	% inibizione	% inibizione
Basale			
0,5	42,5	52,8	34
1	69,1	70	70
2	77,6	70	73,6
4	79,8	76	79,2
7,5	82	75	81,5

Anche formulazioni contenenti SMP hanno mostrato un potente effetto inibitorio della chemiluminescenza prodotta dai PMN umani con la procedura già descritta, con risultati sovrapponibili a quelli già osservati con esametafosfato

Esempio 7 EFFETTO SULLA VITALITA' DEI  
POLIMORFONUCLEATI (PMN) UMANI

Metodica per la determinazione della vitalità dei PMN



Le soluzioni sono state preparate solubilizzando l'esametafosfato sodico in PBS e aggiungendo PMN ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ), ottenuti da sangue venoso di volontari sani. L'incubazione è stata effettuata a  $37^\circ\text{C}$  per 5 minuti. Successivamente è stato aggiunto il Trypan blue e le cellule osservate al microscopio, calcolando il numero di cellule vitali.

#### Prove con SEMP

E' stata testata la vitalità dei PMN in contatto con soluzioni contenenti quantità scalari di esametafosfato sodico in presenza o meno degli stessi antiossidanti e/o antiradicalici utilizzati per le prove di inibizione della chemiluminescenza. Per ogni concentrazione sono stati misurati anche il pH e l'osmolalità (il pH di tutte le soluzioni è stato riportato a 7.5). I risultati sono riportati nella tabella 7.A.

Tabella 7.A

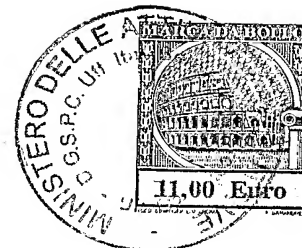
Concentrazione di SEMP in PBS (mg/ml)	pH	Osmolalità (mOsm)	% Vitalità PMN
0.5	7,5	273	100
1	7,5	274	97
2	7,5	274	96
4	7,5	280	92
7,5	7,5	294	80
15,0	7,5	322	75

Nessuna delle concentrazioni testate ha causato una marcata riduzione della vitalità dei PMN, se si eccettua la massima concentrazione testata (15 mg/ml).

L'esperimento è stato ripetuto utilizzando formulazioni contenenti esametafosfato e vari antiossidanti (si veda Esempio 6), senza effetti dannosi sulla sopravvivenza dei PMN. I risultati sono riportati nella tabella 7.B.

Tabella 7.B

Formulazione	pH	Osmolalità (mOsm)	% Vitalità PMN
A	7,5	297	98
B	7,5	292	99
C	7,5	306	98
D	6,7	310	98
E	6,9	312	97
F	7,0	304	93
G	7,2	302	98
L	6,6	302	91
N	6,6	297	97
O	7,3	290	97



#### Prove con SMP

E' stata testata la vitalità dei PMN in contatto con soluzioni contenenti quantità scalari di metafosfato sodico in presenza o meno degli stessi antiossidanti e/o antiradicalici utilizzati per le prove di inibizione della chemiluminescenza. Per ogni concentrazione sono stati misurati anche il pH e l'osmolalità (il pH di tutte le soluzioni è stato riportato a 7.5). I risultati sono riportati nella tabella 7.A.

Tabella 7.C

Concentrazione di SMP in PBS (mg/ml)	pH	Osmolalità (mOsm)	% Vitalità PMN
0,5	7,5	268	99
1	7,5	269	97
2	7,5	271	98
4	7,5	282	93
7,5	7,5	292	84
15,0	7,5	320	74

Nessuna delle concentrazioni testate ha causato una marcata riduzione della vitalità dei PMN, se si eccettua la massima concentrazione testata (15 mg/ml).

L'esperimento è stato ripetuto utilizzando formulazioni contenenti metafosfato di sodio e antiossidanti (si veda Esempio 6), senza effetti dannosi sulla sopravvivenza dei PMN. I risultati sono riportati nella tabella 7.B.

Tabella 7.B -

Formulazione	pH	Osmolalità (mOsm)	% Vitalità PMN
A1	7,4	295	96
B1	7,4	290	97
C1	7,4	304	99
D1	6,6	308	95
E1	6,8	310	98
F1	6,9	302	90
G1	7,1	300	98
L1	6,5	299	88
N1	6,5	295	96
O1	7,2	287	94

#### Esempio 8 MISURAZIONE DI INIBIZIONE DELL'ANIONE SUPEROSSIDO

##### Metodica per la determinazione dell'anione superossido

L'avvenuta produzione dell'  $O_2^{\cdot -}$  da parte dei PMN stimolati [in questo caso la stimolazione è stata effettuata con Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)], è stata valutata tramite la riduzione del citocromo-C, come descritto nel metodo di English [English D, Roloff JS, Lukens JN. Regulation of human polymorphonuclear leucocyte superoxide release by cellular response to chemotactic peptides. *J Immun* **126**: 165-171 (1981)]. A tale scopo ad un'aliquota di 750  $\mu$ l di PBS sono stati aggiunti nell'ordine: 100  $\mu$ l di citocromo-C (30 mg/ml), 100  $\mu$ l di stimolatore e 100  $\mu$ l di sospensione cellulare. Il preparato è stato incubato per 25' a

37°C; successivamente si è proceduto all'aggiunta di 50  $\mu$ l di superossido dismutasi (SOD) 1 mg/ml, 75000 unità (Sigma) per fermare la reazione, infine è stata effettuata una centrifugazione per 10 minuti a 4°C e una lettura spettrofotometrica (Beckman DU6) del sovranatante a 550 e 468 nm. Il "bianco" è stato preparato introducendo la SOD in un campione prima di tutti gli altri reagenti. I PMN sono stati preparati come precedentemente descritto, lo stimolatore (PMA) è stato preparato come descritto nel metodo di English. I risultati sono espressi in nMoli/10<sup>6</sup> di PMN.

E' interessante osservare che l'effetto scavenger sull'anione superossido è direttamente proporzionale alla concentrazione del solo esametafosfato in PBS e risulta altamente evidente alla concentrazione di 5 mg/ml. L'aggiunta di antiossidanti come mannitolo e taurina (Formulazione O con 0,5mg/ml SEMP) ha modificato considerevolmente l'attività antiossidante dell'esametafosfato, da solo a pari concentrazione.

#### Prove con SEMP

I risultati sono riassunti nella tabella 8.A

Tabella 8.A

Tabella 8.A Formulazioni	Prova1	Prova 2
	% inibizione	% inibizione
Basale		
PBS +SEMP 0,5mg/ml	12,5	14,0
PBS + SEMP 1 mg/ml	30,8	38,8
PBS + SEMP 2 mg/ml	43,7	47,7
PBS + SEMP 5 mg/ml	53,1	56,2
Formulazione O	78,6	74,7

Formulazione E	75	70
Formulazione G	69,7	79,7

Inaspettatamente l'esametafosfato ha mostrato un potere inibitorio sulla produzione dell'anione superossido, in maniera direttamente proporzionale alla sua concentrazione. La presenza di altre sostanze antiossidanti e/o antiradicaliche potenzia tale effetto inibente.

L'esperimento dell'anione superossido dimostra, più di quanto non venga già dimostrato dall'esperimento della chemiluminescenza, l'estrema importanza dal punto di vista terapeutico e l'elevato grado di innovatività dal punto di vista brevettuale, dell'associazione dei polimetafosfati con sostanze antiossidanti e/o antiradicaliche

Inoltre le formulazioni C, E e G possono essere considerate le formulazioni di contenimento o meglio di lavaggio dell'articolazione dopo che si è intervenuti con le soluzioni contenenti esametatosfato di sodio. Può essere considerato come un punto raggiunto per le soluzioni di contenimento.

*alga ca passo*



## RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica solubile per il trattamento di patologie articolari comprendente una quantità efficace di almeno un polimetafosfato lineare o ciclico o un suo sale solubile e farmaceuticamente accettabile, e eventualmente opportuni diluenti.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1 in cui il sale del polimetafosfato è un sale sodico di formula  $(\text{NaPO}_3)_n$ .
3. Composizione secondo la rivendicazione 1 in cui il polimetafosfato è compreso nel seguente gruppo: metafosfato polimerico (SMP); tripolimetafosfato (PSTP); trimetafosfato ciclico (TSMP), esametafosfato ciclico (SEMP).
4. Composizione secondo una delle rivendicazioni precedenti comprendente ulteriormente quantità efficaci di antiossidanti e/o antiradicali dell'ossigeno e dell'anione ipoclorito
5. Composizione secondo la rivendicazione 4 in cui gli antiossidanti sono compresi nel seguente gruppo: mannitolo, vitamina E, vitamina C, carotenoidi, tocoferolo, taurina, glucosamina solfato, glucosamina cloridrato.
6. Composizione secondo una delle rivendicazioni precedenti comprendente ulteriormente ad almeno una sostanza "scavenger" ad azione antiradicali.
7. Formulazione farmaceutica iniettabile per via intraarticolare comprendente un primo contenitore, contenente la composizione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3 in polvere, e un secondo contenitore contenente una soluzione di diluente in cui è disciolta almeno una sostanza ad azione antiradicalica e/o una sostanza ad



azione anti-ossidante, e in cui la composizione del primo contenitore viene disciolta prima dell'uso.

8. Formulazione farmaceutica iniettabile da utilizzare per lavaggio in continuo di un'articolazione comprendente un primo contenitore, contenente la composizione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3 in polvere, e un secondo contenitore contenente una soluzione di diluente in cui è disciolta almeno una sostanza ad azione antiradicalica e/o una sostanza ad azione anti-ossidante, e in cui la composizione del primo contenitore viene disciolta prima dell'uso.

9. Formulazione farmaceutica di contenimento da utilizzarsi dopo la solubilizzazione di cristalli di CPPD o HAP in un'articolazione comprendente un contenitore contenente una soluzione di diluente iniettabile per via intraarticolare, leggermente ipotonica, in cui è disciolta almeno una sostanza ad azione antiradicalica dell'ossigeno e antianione ipoclorito.

10. Soluzione ipotonica acquosa in cui è disciolta la composizione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 6.

p.p.: Università degli Studi di Siena

de Simone & Partners SpA

(OC)

*dgs apasso*

